

64-27471

-4- (WPAT)

ACCESSION NUMBER

CROSS REFERENCE

SECONDARY ACCESSION

TITLE

DERWENT CLASSES

PATENT ASSIGNEE

INVENTORS

PRIORITY

NUMBERS

PUBLICATION DETAILS

89-073879/10

91-098565 95-151479 96-449892

C89-032968

Transglutaminase for gelation of protein -  
catalyses aryl-rearrangement reaction of  
gamma-carboxy:amide gp. in glutamine residue  
in peptide chain in absence of calcium ion  
D16 L03 U11

(AJIN ) AJINOMOTO KK; (AMAN ) AMANO PHARM KK;  
(AJIN ) AJINOMOTO CO INC

ANDO H, MATSUURA A, MOTOKI M, NONAKA M,  
OKIYAMA A, TANAKA H, UCHIO R, UMEDA K

87.03.04 87JP-049157 87.07.01 87JP-165067

89.01.23 89EP-101143 89.01.23 89DE-617582

7 patent(s) 5 country(s)

JP01027471 A 89.01.30 \* (8910) 16p

EP-379606 A 90.08.01 + (9031)

R: DE FR GB

US5156956 A 92.10.20 (9245) 18p

C12N-009/10

EP-379606 B1 94.08.17 + (9432) E 28p

C12N-009/10

R: DE FR GB

E 28p

JP94065280 B2 94.08.24 (9432) 17p

A23L-001/03

DE68917582 E 94.09.22 + (9437)

C12N-009/10

EP-379606 B2 99.07.28 + (9934) E

C12N-009/10

R: DE FR GB

E

CITATIONS

APPLICATION DETAILS

2.Jnl.Ref; 02Jnl.Ref

87JP-165067 87.07.01

89EP-101143 89.01.23

88US-162988 88.03.02 91US-726722 91.07.01

89EP-101143 89.01.23

87JP-165067 87.07.01

89DE-617582 89.01.23 89EP-101143 89.01.23

89EP-101143 89.01.23

A23L-001/03 C12N-009/10

A23C-009/12 A23C-019/03 A23J-003/00

C12P-021/00 C12R-001/01

C12N-009/10 C12R-001:01

JP01027471 A

Transglutaminase (BTGase) catalysing  
acyl-rearrangement reaction of  
gamma-carboxyamide gp in the glutamine  
residue in a peptide chain in the absence of  
Ca2+ is new.

The enzyme (BTGase) can be obtd by  
incubation of Streptovercillum  
griseocarneum (IFO 12776),  
Streptovercillum cinnamoneum sub sp.  
cinnamoneum (IFO 12852) and  
Streptovercillum mobaraenae (IFO 13819).  
The enzyme derived from IFO 12776 is called

MAIN INT'L CLASS.

SECONDARY INT'L. CLASS.

LINKED INT'L CLASS.

ABSTRACT

BTG-1; that from IFO 12852 is called BTG-2;  
and that from IFO 13819 is called BTG-3.

USE/ADVANTAGE - BTGase catalyses  
gellation of a protein-contg soln of slurry  
(protein content, 1.0 wt% or more). The  
enzyme is derived from microorganisms and can  
be produced inexpensively and easily. Using  
the enzyme, proteins can be gelled in the  
absence of Ca. Even in the presence of Ca,  
the enzyme concn and the substrate concn may  
be extremely low, and gelled prod of high  
quality can be obtd. (Dwg.0/12)

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭64-27471

⑬ Int.Cl.<sup>4</sup>C 12 N 9/10  
C 12 P 21/00

識別記号

庁内整理番号

7823-4B  
Z-6712-4B※

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月30日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全16頁)

⑮ 発明の名称 新規酵素及びそれを用いるタンパクゲル化物の製造法

⑯ 特 願 昭62-165067

⑰ 出 願 昭62(1987)7月1日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)3月4日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-49157

㉑ 発 明 者 本 木 正 雄 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉒ 発 明 者 沖 山 敦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉓ 発 明 者 野 中 雅 彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

㉔ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

㉕ 出 願 人 天野製薬株式会社 愛知県名古屋市市中区錦1丁目2番7号

最終頁に続く

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

新規酵素及びそれを用いるタンパクゲル化物の製造法

## 2. 特許請求の範囲

1.  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下でペプチド鎖内のグルタミン残基の $\alpha$ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する新規トランスグルタミナーゼ。

2.  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下でペプチド鎖内のグルタミン残基の $\alpha$ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する新規トランスグルタミナーゼの作用により、タンパク質濃度1.0重量%以上のタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させることを特徴とするタンパクゲル化物の製造法。

3. 新規トランスグルタミナーゼがタンパク含有溶液又はスラリー中のタンパク質1.0gに対して0.01~2000ユニット添加されることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載の製造法。

## 3. 発明の詳細な説明

〔利用分野〕

本発明は新規なトランスグルタミナーゼ及びこれを用いるタンパクゲル化物の製造法に関する。

トランスグルタミナーゼは、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の $\alpha$ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。

このトランスグルタミナーゼは、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基の $\epsilon$ -アミノ基が作用すると、分子内及び分子間に $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Ly $\epsilon$ 架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

また、この新規トランスグルタミナーゼを利用して製造される本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品、ゲル状化粧料をはじめとしてヨーグルト、ゼリー、チーズ、ゲル状化粧料などとして用いられる。

更に、本発明に係るゲル化物は、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであるため、マイクロカプセルの素材、固定化酵素等の担体などとしても広

範囲に用いることができるものである。

#### 〔従来技術〕

トランスグルタミナーゼはこれまで動物由来のものが知られている。例えばモルモットの肝臓 [Connellan, et al., ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 246巻4号, 1093~1098頁 (1971)] 及び哺乳動物の臓器、血液に広く分布し [Folk et al., アドバンセス・イン・エンザイモロジー (Advances in Enzymology) 38巻, 109~191頁 (1973)], [Folk et al., アドバンセス・イン・プロテイン・ケミストリー (Advances in Protein Chemistry) 31巻, 1~133頁 (1977)], その酵素の特徴も研究されている。

しかし、現時点では微生物由来のトランスグルタミナーゼについては報告されていない。また、動物由来のトランスグルタミナーゼを用いるタンパク質のゲル化物の製造法については本発明者等が既に研究を行なっている (特開昭58-149645

能性はほとんど考えられなかった。

従って、本発明の課題は供給量、コストの面、精製の容易さ等のいずれの面からも問題はなく、しかも反応に  $\text{Ca}^{2+}$  を必要としない点等、実用性の高い微生物由来の新規トランスグルタミナーゼ及び本酵素を作用させて得られるタンパクゲル化物の製造法の提供である。

#### 〔問題点を解決するための手段〕

これまで動物由来の酵素が検討されてきたが実用性に欠けるため、本発明者等は給源を微生物に求め広く検索を行った結果、ストレプトペルチシリウム属の菌について  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下でペプチド鎖内のグルタミン残基の  $\gamma$ -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する従来にない新規トランスグルタミナーゼ産生能があることが分かった。またこの酵素を用いることにより、タンパク質濃度1.0%以上のタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させてタンパクゲル化物を製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

ストレプトペルチシリウム属の菌を具体的に示

号)。

しかし、この動物由来のトランスグルタミナーゼの産業への利用、特にタンパク質のゲル化物の製造法には以下に述べるような欠点を有する。

動物由来のトランスグルタミナーゼは安価にまた大量に入手するのが困難である。また、ゲル化させるのには、この高価な酵素が基質タンパク質1gあたり、1ユニット以上必要でかつ、基質タンパク濃度が2.0重量%以上必要であるという制限があること、更には、この動物由来のトランスグルタミナーゼはカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 依存性である為に用途が制限される。

以上のような欠点を有する為に、動物由来のトランスグルタミナーゼを用いるゲル化物の製造についての実用化は困難であるのが現状である。

#### 〔発明が解決しようとする問題点〕

従来トランスグルタミナーゼの供給は動物に由来しているため実用性を考慮した場合、供給量、供給費用、保存費用、精製の困難さ等の種々の面から不利でありこのままでは産業上の利用への可

すと、ストレプトペルチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptovercillium griseocarneum*) IFO 12776, ストレプトペルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (*Streptovercillium cinnamoneum sub sp. cinnamoneum*) IFO 12852, ストレプトペルチシリウム・モバラエンヌ (*Streptovercillium mobaraense*) IFO 13819 等があげられる。

これら微生物を培養し、トランスグルタミナーゼ (尚、以後 BTGase と記す) を取得するための培養法及び精製法等について述べる。本発明を実施するにあたり、その培養形態としては液体培養、固体培養いずれも可能であるが工業的には深部通気攪拌培養を行うのが有利である。又使用する培養源としては一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩及びその他の微量栄養源の他、ストレプトペルチシリウム属に属する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としてはブドウ糖、シロ糖、ラスターゲン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、

油脂、有機酸などが単独で又は組合せて用いられる。窒素源としては無機窒素源、有機窒素源のいずれも使用可能であり無機栄養源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、塩化アンモニウム等が挙げられる。又有機窒素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、糖、脱脂粕をはじめコーンステイプリーカー、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量栄養素としてはリン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の塩類の他ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育やBTGaseの生産を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。培養は好氣的条件で、培養温度は菌が発育しBTGaseが産生する範囲であれば良く、好ましくは25〜35℃である。培養時間は条件により異なるがBTGaseが最も産生される時間まで培養すれば良く、通常2〜4日程度である。BTGaseは液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固形分を除いた培養ろ液より採取される。

キサム酸の量を検量線より求め活性を算出する。BTGase活性は特に記載しないかぎり以下に記載する方法により測定した。

#### <活性測定法>

試薬A 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0)  
0.1 M ヒドロキシルアミン  
0.01 M 還元型グルタチオン  
0.03 M ペンゾルオキシカルボニル-L-  
-グルタミニルグリシン

試薬B 3 N - 塩酸  
12% - トリクロロ酢酸  
5%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.1 N -  $\text{HCl}$  に溶解)  
上記溶液の1:1:1の混合液を試薬Bとする。

酵素液の0.05 mlに試薬A 0.5 mlを加えて混合し37℃で10分間反応後、試薬Bを加えて反応停止とFe錯体の形成を行った後525 nmの吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵

培養ろ液よりBTGaseを精製するには通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えばエタノール、アセトン、イソプロピ<sup>ル</sup>アルコール等の有機溶媒による処理、硫酸、食塩等による塩析、透析、限外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、吸着剤、等電点分画等の方法が使用出来る。又これらの方法を適当に組合せる事によりBTGaseの精製度が上る場合は適宜組合せて行い事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は安定化剤として各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、限外ろ過膜縮、逆浸透膜縮、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固形のBTGaseを得ることが出来る。

BTGaseの活性測定はペンゾルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体を形成させ525 nmの吸収を測定し、ヒドロ

素液のかわりにL-グルタミン酸γ-モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1 μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

このようにして得られる精製BTGase、即ちストレプトベルチシリウム・モバランス (*Streptovorticillium mobaraense*) IFO 13819 のトランスグルタミナーゼ (BTG-1と命名)、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptovorticillium griseocarneum*) IFO 12776 のトランスグルタミナーゼ (BTG-2と命名)、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (*Streptovorticillium cinnamoneum sub sp. cinnamoneum*) IFO 12852 のトランスグルタミナーゼ (BTG-3と命名) についての酵素化学的性質について以下に記す。

#### a) 至適pH:

基質としてペンゾルオキシカルボニル-L-グルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを

使用した場合、37℃、10分反応でBTG-1の至適pHは6～7にあり、BTG-2の至適pHは6～7付近にあり、BTG-3の至適pHは6～7付近にある(第1図、第5図、及び第9図に示される。)

b) 至適温度:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンシルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、pH6、10分反応でBTG-1の至適温度は55℃付近であり、BTG-2の至適温度は45℃付近であり、BTG-3の至適温度は45℃付近にある(第2図、第6図、及び第10図に示される。)

c) pH安定性:

37℃、10分間処理でBTG-1はpH5～9で安定であり、BTG-2はpH5～9で安定であり、BTG-3はpH6～9で安定である(第3図、第7図、第11図に示される。)

d) 温度安定性:

pH7で10分間処理ではBTG-1は40℃では88%活性が残存し、50℃では74%活性が

残存し、BTG-2は40℃では86%活性が残存し、50℃では56%活性が残存し、BTG-3は40℃で80%活性が残存し50℃では53%活性が残存する(第4図、第8図、及び第12図に示される。)

e) 基質特異性:

各BTGaseを用い、各種合成基質とヒドロキシルアミンとの反応を調べた。いずれのBTGaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギンシルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミン、グリシルグルタミンシルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジルオキシカルボニルグルタミンシルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質濃度は5mMとした。結果は表-1に示される。なお表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミン基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギン基の略である。

表 - 1

基 質	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
CBZ-Gln-Gly	100	100	100
CBZ-Gln-Gly-oEt	63	44	42
CBZ-Gln-Gln-Gly	38	39	35
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11
CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly	23	58	60
CBZ-Gln	0	0	0
CBZ-Asp-Gly	0	0	0
Gly-Gln-Gly	0	0	0

f) 金属イオンの影響:

活性測定系に1mM濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた(結果は表-2に示される。)。いずれのBTGaseもCu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>により活性が阻害される。

表 - 2

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
None	100	100	100
CaCl <sub>2</sub>	101	102	102
BaCl <sub>2</sub>	101	99	105
CoCl <sub>2</sub>	103	103	103
CuCl <sub>2</sub>	79	82	86
FeCl <sub>3</sub>	96	104	106
KCl	96	99	105
MgCl <sub>2</sub>	102	104	103
MnCl <sub>2</sub>	98	97	97
NaCl	99	102	101
NiCl <sub>2</sub>	102	100	101
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	97	97	100
SrCl <sub>2</sub>	100	101	100
ZnCl <sub>2</sub>	15	24	24

## g) 阻害剤の影響:

各阻害剤を1 mMになるように加え、25℃、30分放置後、活性を測定した(結果は表-3に示される)。いずれのBTGaseもパラクロマーマーキュリー安息香酸(PCMBと略する)、N-エチルマレイミド(NEMと略する)、モノヨード酢酸により活性が阻害される。

表 - 3

阻 害 剤	BTG-1	BTG-2	BTG-3
	%	%	%
None	100	100	100
EDTA	102	98	99
PCMB	54	61	63
NEM	5	5	3
モノヨード酢酸	64	50	67
PMSF	104	95	101

表-3中PMSFはフェニルメチルスルホニルフルオリドの略である。

基質特異性に差が見られる。またCa<sup>2+</sup>の存在下及び非存在下においても本発明のBTGaseは作用する点等でも明らかな差がみられる。従って本発明の各酵素はMTGaseとはその性質を異にするものと考えられる。

表 - 4

	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
至適pH	6~7	6~7	6~7	6
pH安定性	5~9	5~9	6~9	6~7.5
至適温度	55℃付近	45℃付近	45℃付近	50~55℃
温度安定性 (%)				
40℃残存率	88	86	80	96
50℃残存率	74	56	53	40
分子量	約38,000	約41,000	約41,000	約90,000
等電点	9.0	9.7	9.8	4.5
基質特異性(%)				
CBZ-Gln-Gly	100	100	100	100
CBZ-Gln-Gly-oEt	63	44	42	122
CBZ-Gln-Gln-Gly	38	39	35	288
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11	126
CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly	23	58	60	27

## h) 等電点:

アンホライン等電点電気泳動により求めたところBTG-1の等電点pIは9付近であり、BTG-2の等電点pIは9.7付近であり、BTG-3の等電点pIは9.8付近である。

## i) 分子量:

SDS ディスク電気泳動法より求めたところ

BTG-1の分子量は約38,000であり、BTG-2の分子量は約41,000であり、BTG-3の分子量は約41,000である。

## トランスグルタミナーゼ

次にBTGaseとモルモット肝由来のモルモットの性質を比較する。尚、モルモット肝由来のトランスグルタミナーゼは特開昭58-149645号に記載された方法で調製した。表-4には各酵素化学的性質の比較を、表-5にはCa<sup>2+</sup>の活性に及ぼす影響を示す。表-4及び表-5より明らかなように従来主として研究されているモルモット肝のトランスグルタミナーゼ(以後MTGaseと記す)と放線菌由来のBTGaseとには酵素化学的性質において種々の差が見られ、特に温度安定性、分子量、等電点、

表 - 5

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
	%	%	%	%
None	99	98	100	0
1mM CaCl <sub>2</sub>	100	100	99	39
5mM CaCl <sub>2</sub>	100	100	98	100

次にBTGaseを用いるタンパクゲル化物の製法について述べる。

まず、基質となるタンパク質は、リジン残基及びグルタミン残基を有し、上述の酵素の触媒をうけるものであれば、その起源、性状に制約されるものではなく、植物性タンパク質、動物性タンパク質、微生物タンパク質、藻類タンパク質などいかなるものでも使用できる。植物性タンパク質としては特にその種類は限定しないが、例えば油糧種子の脱脂物及びそれらより分離したタンパク質などを挙げることができる。また動物性タンパク質としては、特にその種類は限定しないが、たとえば乳タンパク、ゼラチン、コラーゲン、血清アル

アミン等を例示することができる。

また本発明に用いる蛋白質としては前記以外にもプロテアーゼなどで部分的に切断したタンパク質、合成ペプチドおよび各種の化学修飾したタンパク質でも、グルタミン残基、リジン残基を有する条件が満たされれば、この酵素の基質とすることができる。

これらのタンパク質の1重量%以上、好ましくは3重量%以上の液体又はスラリーであれば、BTGaseの添加により高粘性物、あるいはゲル状物が形成され、1重量%以下であれば、溶液状又は沈殿状の架橋高分子化物が得られる。BTGaseはタンパク1gに対して0.01~2000 Unit添加、好ましくは0.1~200 Unit以上添加、反応溶液のpHは4~10、好ましくは5~8に調整し、5~80℃、好ましくは40~60℃で10秒~24時間、好ましくは10分~2時間インキュベートすると架橋高分子化物ないしはゲル状物を得ることができる。このように、本発明のBTGaseは低い酵素濃度でゲル化できる(基質タンパク質1gあたり

0.01ユニット以上あればよい)、及び低い基質濃度で使用できる(基質タンパク質濃度1重量%以上あればよい)等の特徴を有する新規な酵素である。

このBTGase処理により十分なゲル化物が得られるが、更に必要により反応終了後のゲル化物を60~200℃で1分間~24時間加熱処理することにより更に強固なゲル化物が得られる。このタンパク含有溶液は単にタンパクと水との混合物に限らず、タンパク、水および油脂を混合した水中油型又は油中水型エマルジョンであってもよく、各種塩類、澱粉、少糖類、多糖類、香料、保湿剤、着色料などもBTGaseによる架橋高分子化及びゲル化と阻害しない範囲で適宜選択して添加することができる。

またタンパク質の種類と量を調整することによって架橋高分子化物の架橋度を変えることができ、これにより、生成するゲルの物性及び含水量を目的と用途に応じて変えることができる。

以下に本発明の実施例について述べる。

#### 実施例1

ストレプトペルチシリウム・モバラエンス(*Streptovorticillium mobaraense*) IFO 13819を培地組成ポリペプトン0.2%、グルコース0.5%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%からなる培地(pH7)200mlに接種し30℃、48時間培養し、得られた種培養液をポリペプトン2.0%、ラスタージン2.0%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%、酵母エキス0.2%、消泡剤としてアデカノール(商品名、旭電化社製品)0.05%からなる培地20ℓ(pH7)に加え30℃で3日間培養後ろ過し培養液18.5ℓ得た。このものの活性は0.35 u/mlである。

培養液を塩酸でpH6.5に調整し、予め0.05Mリン酸緩衝液(pH6.5)で平衡化しておいたCG-50(商品名、オルガノ社製品)のカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに0.05~0.5Mの同緩衝液の濃度勾

配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性の高い分画を集めた。電導度を10ms以下になるように希釈後ブルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスグルタミナーゼは吸着された。更に0.05Mリン酸緩衝液(pH7)で不純蛋白質を洗い流した後、0~1Mの食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し比活性の高い画分を集めた。UF6000膜を使い濃縮し、0.5Mの食塩を含む0.05Mリン酸緩衝液(pH7)で緩衝液を用いて平衡化させた。

得られた濃縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシアファインケミカル社製)を含むカラムに通し、同緩衝液を流して溶出液を分画した。この結果活性画分は単一のピークとして溶出された。このものの比活性は培養ろ液に対し625倍であり、回収率は47%であった。

#### 実施例2

実施例1と同様にしてストレプトペルチシリウム・グリセオカルネウム(*Streptovorticillium*



griseocarneum) IFO 12776 を 30℃ で 3 日間培養後ろ過し培養液 1.9 l を得た。このものの活性は 0.28 u/ml であった。

実施例 1 と同様な方法で酵素を精製して SDS デイスク電気泳動で単一の酵素を得た。

#### 実施例 3

実施例 1 と同様にしてストレプトペルテシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (*Streptoverticillium cinnamomeum* sub sp. *cinnamomeum*) IFO 12852 を 30℃ で 3 日培養後ろ過し培養液 1.8.5 l を得た。このものの酵素活性は 0.5 u/ml であった。

実施例 1 と同様な方法で酵素を精製して SDS デイスク電気泳動で単一の酵素を得た。

#### 実施例 4

(1) 特開昭 58-149645 号の実施例 1 に記載された方法により調製または購入した食品タンパク類、すなわち①  $\alpha_1$ -カゼイン、② Na-カゼイネート③大豆 118 グロブリン④大豆 7 S グロブリン⑤分離状大豆タンパク「アジプロン S-2」(味の

度は 1.5% であった。これに実施例 4 と同様の条件で BTGase を添加しゲル化能を調べた。結果は表 6 に示した。

(3) BTGase の基質とするためエビミオシンを次のように調製した。

新鮮(生)甘えび(体長約 5 cm)の皮をむきエビ屈曲筋肉をとり出し、ミンチ後、氷水洗浄し、更に冷却下 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF 存在下でホモジナイズし、遠心分離でアクトミオシンを抽出分離した。更に  $10^5 \times g$  で 60 分間超遠心操作によりアクチンを除きミオシンに富んだ画分を得た。更に希釈沈殿/超遠心操作を繰り返し、エビ精製ミオシンを得た。この精製ミオシンは Ca-ATPase 活性がなくアクチンとの結合能も消失していることから、変性ミオシンであることがわかった。このタンパク濃度 3.6% の変性エビミオシン溶液 5 ml (緩衝液、0.5 M KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5) 5 mM DTT) に対し 3.6 ユニットの BTGase を添加し、35℃ の水浴中に浸漬することによって反応を開始し、最大 35 分間反応さ

の案製)⑥水抽出大豆タンパク⑦酸沈澱大豆タンパク⑧大豆タンパク粒子⑨大豆タンパクミセル⑩ゼラチンの各 5, 10 重量パーセントの溶液または懸濁液 5 ml に、実施例 1 で調製した BTGase (凍結乾燥品 比活性 2.50 Unit/mg protein) をタンパク 1 mg 当り 0.02 U 加え、55℃、1 時間 ~~低温~~ 浸漬し、~~浸漬~~ 後にチンキュベートした。室温放置後、サンプルの入った試験管を倒置し、流れ落ちるか、どうかでゲル化を判定した。結果は表 6 に示した。

(2) BTGase の基質とするためウサギミオシンを次のように調製した。

Perry の方法 (Perry, S. V. (1955), "Methods in Enzymology" vol 2 pp 582-588, Academic Press, New York) に従い、ウサギの骨格筋 25 g より 3 倍量の 0.45 M KCl, 5 mM ATP-MgCl<sub>2</sub>, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4) 中で 0℃、30 分間ミオシンを抽出し、以下希釈沈殿によって集め 0.5 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.5) 溶液に透析し、 $10^5 \times g$  で 60 分間遠心分離した上清を精製ミオシンとして使用した。タンパク濃

せた。

以上のゲル化能の実験結果をまとめると表 6 のようになった。

尚、比較例として、MTGase によるゲル化能試験結果も示した。尚、MTGase の添加量は基質たんぱく質 1 mg 当り 0.1 U とした。

表 6 各種タンパク質のTGaseによるゲル化(試験管倒置法)

食品タンパク質	濃度(%)	BTGase	MTGase
$\alpha_{s1}$ -カゼイン	5 10	○ ○	○ ○
Na-ガゼインネート	5 10	○ ○	△ ○
大豆118グロブリン	5 10	○ ○	△ ○
大豆78グロブリン	5 10	○ ○	× ○
アソブロン8-2	5 10	○ ○	× ○
水抽出大豆タンパク	5 10	○ ○	× ○
脱脂大豆タンパク	5 10	○ ○	× ○
大豆タンパク粒子	5 10	○ ○	× △
大豆タンパクミセル	5 10	△ ○	× △
ゼラチン	5 10	○ ○	× ○
ウサギミオシン	1.5	○	○
エビミオシン	3.6	○	○

(注) ○:ゲル化  
△:弱いゲル  
×:溶液のまま  
MTGaseは37℃,1時間反応させた。

9.3 M 臭化リチウム (LiBr) 溶液 100 ml に加え、40℃で一晩攪拌すると粗糸は可溶化した。この溶液に対し吸引ろ過、対水透析を行い粗絹蛋白質水溶液(約2重量%)を得た。予め試験管内に最終濃度が0.01U, 0.02U, 0.04U/mg protein となるように実施例4と同じBTGaseを入れておき、シェアリングによるゲル化をさけるため静かに絹蛋白質水溶液を加えた。対照としてBTGase未添加のものも用意した。各々の試験管を室温で一晩放置後試験管内の試料の状態を観察し表8の結果を得た。

表 8

試料	状態
絹蛋白質水溶液-BTG	×
" + BTG (0.01U/mgタンパク質)	○
" + " (0.02U/ " )	○
" + " (0.04U/ " )	○

(注) ×:試験管倒置により落下。透明溶液状  
○: " しても落下せず。白濁ゲル状

## 実施例5

ゼラチン〔新田ゼラチン製〕に5.10重量パーセント溶液となるように0.1M トリス-HCl buffer (pH 7.6)を加え、60℃, 3分で完全にゼラチンを溶解し実施例4と同じBTGaseを0.02U/mg proteinを加えよく攪拌後37℃, 1時間反応させた後、沸とう水浴中に10分間加熱した直後の状態を観察した。

尚、BTGaseを添加しない以外は全く同一の処理をしたものを対照とした。結果は表-7に示した。

表 - 7

	- BTG	+ BTG
5% ゼラチン	×	○
10% ゼラチン	×	○

(注) ×:完全な溶液  
○:ゲル状態(加熱しても溶解しない)

## 実施例6

BTGaseの基質とするため、絹蛋白質水溶液を以下の方法で調製した。脱脂ずみの粗糸2.33gを

## 実施例7

市販牛乳(粗タンパク2.9%)を約5倍(粗タンパク14.5%)に減圧濃縮して得た濃縮牛乳1gに対して、実施例4に示したBTGaseを2ユニットを加えて攪拌し、55℃, 30分インキュベートした。生じたゲル状物を80~95℃, 20分加熱し残存酵素を失活させた後、冷却するとプリン状のゲル食品を得た。要すれば、10%程度まで砂糖を添加しても同様のゲル状物を得ることができた。

## 実施例8

市販牛乳(粗タンパク2.9%, 油脂3.2%, 水分89%)を約5倍に減圧濃縮し、濃縮牛乳(約10%)とし、これに30%のグルコノアルタラクトン溶液100mlを加え、速やかに混合した後、pH 6.0以上であることを確認してから、実施例4に示したBTGase 100ユニット加えて、攪拌し、45℃, 45分間インキュベーター中に静置させゲル化させた。かかる後にゲルを壊さないようにゲルを80~95℃迄加熱し、BTGaseの失活と

グルコノデルタラクトンのグルコン酸への分解を行ない、ゲルのpHを4～5に調整させた。そして冷却後、カード状のゲルを約8cm角にカッティングし、酸塩法で2%程度の塩濃度にしてPen-caseicolum(ペニシリウム・カセイコラム)のスターターを接種し、15℃、3週間、RH85%で熟成させ、チーズを得た。

尚、グルコノデルタラクトンを用いない場合は、乳酸菌(Lactobacillus acidophilus, ラクトバチルス・アシドフィラス)を添加し、BTGaseでゲル化後、40℃で2～5hr発酵させても同じようなチーズが得られた。

本法で得られるチーズは、高価な子牛のレンネットを使用せずに製造することができ、またその物性は、かなりしなやかな弾性をもつ品質の良いものであった。

#### 実施例9

実施例8の濃縮乳(1ℓ)を5℃前後に冷却して、Streptococcus thermophilus(ストレプトコッカス・サーモフィラス)からなるスターター

型くずれしない品質の良い豆腐様ゲルができた。

#### 実施例11

丸大豆6.5kgを20kg位の水に満たし、常温で1晩充分吸水膨潤させたものを、水を加えながら磨砕機ですりつぶし「ど」を得た。これに更に水を2.5kg加え、どを薄め少量の消泡剤を添加し煮釜に移し、スチームを吹き込んで加熱した。加熱条件は5分かけて100℃まで上げ、3～5分保つ方法がよい。煮込み後おから絞り機でおからを除き濃厚豆乳(粗タンパク7.0%, 油分8.1%, 水分7.5%)30kg得た。これに実施例4に示したBTGaseを200ユニット加えて直ちにケーシングチューブ(塩化ビニリデンチューブ)に充填し、37℃、30分湯浴中で加熱した。次に90℃以上の湯浴中に移し、加熱(30～60分)し、流水中で豆腐様ゲルを得た。

#### 実施例12

表9のレシピでカマボコを試作し、レオメーター(不動工業(株)製)による物性測定と官能評価(n=10)を実施した。なおBTGaseの添加量

(5%程度)をすばやく添加混合し、更に実施例4と同様のBTGase 1ユニット加えて攪拌し、35℃、1hrインキュベーターの中で静置ゲル化させた。次にゲル温度を50℃、40分間加熱し、S. thermophilusによって酸を生成せしめかつフレーバーを増加せしめた後、更に75～85℃に加熱せしめBTGaseを失活させた。冷却すると軽い酸味を持つ品質の優れたヨーグルト様食品が得られた。

#### 実施例10

市販豆乳(明治乳業製、サングロー豆乳、粗タンパク3.1%)を約2.5倍に減圧濃縮し、更に20℃以下に冷却して得られた濃縮豆乳(粗タンパク7.75%)1ℓに対し、実施例4に示したBTGaseを4ユニット加えてプラスチック容器に充填し、フタをシールした後、55℃の湯浴中で30分加熱し、酵素反応させゲル化した。しかる後に高周波誘電加熱装置(電子レンジ、2450メガヘルツ、波長12cm)を用いて加熱した。通常の絹ごし豆腐、木綿豆腐と比較するとしなやかで、

はすり身乾物1ℓに対して20Unitであり、酵素反応はBTGase無添加のコントロールのすわり工程と同様に34℃、2時間とし、反応終了後85℃、30分間加熱して製品とした。

表 9

	コントロール (%)	BTGase添加 (%)
すり身C級	66.9	66.9
馬鈴薯澱粉	6.7	6.7
みりん	2.0	2.0
砂糖	2.0	2.0
食塩	1.7	1.7
MSG	0.7	0.7
水	20.0	19.3
BTGase	0	0.2

物性測定および官能評価の結果を表10、11に示す。

表 10

	破断強度 (g)	歪 (%)
コントロール (BTGase 無添加)	454 ± 50	44.3 ± 2.3
BTGase	804 ± 58	46.3 ± 1.3

以上のように BTGase を添加して試作したカマボコは筋原繊維蛋白質の間に  $\epsilon$ -(rGlu)Lys 架橋が生成するためコントロールに比べて破断強度が増し、好ましい食感となることがわかった。

## 実施例 13

表 12 のレシピでソーセージを試作し、レオナー (株) 山電製) による物性測定と官能評価 ( $n=10$ ) を実施した。なお BTGase の添加量は豚肉乾物 1g に対して 1 Unit であり、酵素反応は 55℃, 2 時間とし、反応終了後、80℃, 30 分間加熱して製品とした。尚、BTGase を添加しないものをコントロールとした。

表 12

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
豚スネ肉	68.4	68.4
食塩	1.5	1.5
亜硝酸ナトリウム	0.02	0.02
アスコルビン酸 Na	0.06	0.06
砂糖	2.1	2.1
MSG	0.4	0.4
ホワイトペッパー	0.3	0.3
水	27.22	27.20
BTGase	—	0.02

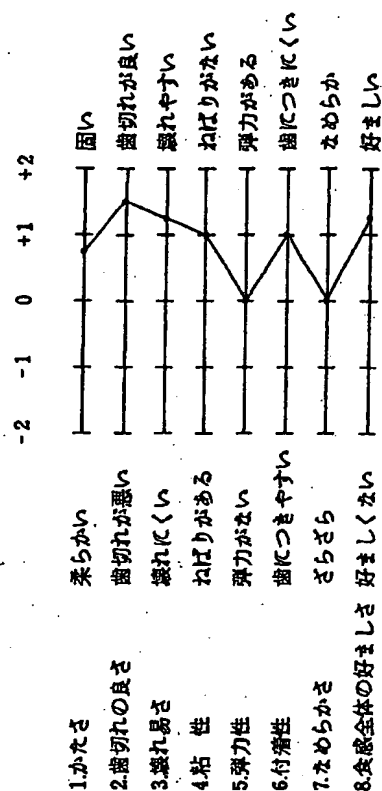
物性測定および官能評価の結果を表 13 及び表 14 に示す。

表 13

	弾性率 ( $\times 10^5 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	粘性率 ( $\times 10^9 \text{ dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-2}$ )
コントロール	4.73	1.48
BTGase 添加	5.83	1.92

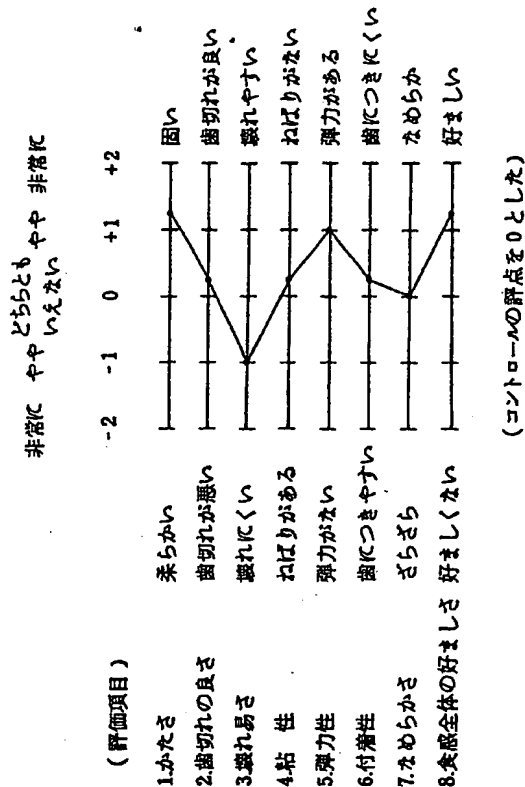
表 11 テクスチャプロファイル

非常に やや どちらとも やや 非常に  
いい えない



(コントロールの評点を 0 とした時)

表 14 テクスチャ・プロフィール



それぞれのホイッピング・クリームを用いてガラス板上に花柄を描いて状態を観察したところ、BTGase を添加したホイッピング・クリームでは画線の鋭い造花が可能となった。

## 実施例 15

表 16 のレシピでアイスクリームを試作し室温に置いた時の形態変化を観察し、メルトダウン耐性を評価した。なお、BTGase の添加量は脱脂粉乳乾物 1g に対して 2.5 Unit であり、酵素反応はアイスクリームミックスの殺菌工程 (68℃, 30 分間) で実施した。殺菌後、5℃で一晩エージングさせたアイスクリームミックスをアイスフリーザー (三菱重工 (株) 製) を用い、品温 -2~-4℃でオーバーラン 90% までフリージングを行い、コーンに充填後、-40℃で硬化させ製品とした。尚、BTGase を添加しない以外は全く同様の操作を行って試作したアイスクリームをコントロールとした。

以上のように BTGase を添加して試作したソーセージは BTGase のゲル形成能によりコントロールに比べて粘弾性に富んだ歯ごたえの好ましい食感となることがわかった。

## 実施例 14

表 15 のレシピでホイッピング・クリームを試作し、絞り出し特性を評価した。なお、BTGase の添加量はカゼイン・ナトリウム乾物 1g に対して 1 Unit であり、ホイップ操作は万能混合攪拌機 (三栄製作所 (株) 製) を用い、7~9℃で実施した。尚、BTGase 無添加のものをコントロールとした。

表 15

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
ヤシ油	25.0	25.0
カゼインナトリウム	5.0	5.0
モノグリセリド	0.3	0.3
水	69.7	69.7
BTGase	—	0.005

表 16

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
ヤシ油	5.0	5.0
脱脂粉乳	8.0	8.0
砂糖	13.0	13.0
水飴	6.0	6.0
グアガム	0.1	0.1
カラギーナン	0.1	0.1
ローカストビーンガム	0.1	0.1
モノグリセライド	0.3	0.3
バニラエッセンス	0.1	0.1
水	67.3	67.1
BTGase	—	0.2

コントロールは室温静置後 15 分で形崩れしてしまったが、BTGase を添加したアイスクリームは 30 分以上も形崩れを起こさず、しかもコントロールと同様、滑らかな口ざわりをしていた。

## 実施例 16

試験管内に所要量の牛皮由来アテロコラーゲン

粉末（高研（株）製）をとり、0.1 M Tris-HCl バッファー（pH 7.5）2 ml を加え、55℃の水浴中に15分間保持した後攪拌することにより3～10%アテロコラーゲン溶液を調製した。高濃度溶液が冷却によるゲル化をおこさないうちにBTGaseを0.05 U/mgタンパク質となるよう添加し、55℃で60分間インキュベートした。全体のコントロールとしてBTGaseを添加しない10%アテロコラーゲン溶液についても同様にインキュベートした。インキュベート終了直後、室温で60分放置後、更にその後100℃の水浴中に15分保持後に試験管内の様子を観察した。その結果を表17に示した。

表 17

	インキュベ ート終了直後	60分放置後	100℃ で加熱後
3%溶液+BTGase	○	○	○
5%溶液+BTGase	○	○	○
10%溶液+BTGase	○	○	○
10%溶液-BTGase	×	○	×

（注） ○：ゲル化している

×：ゲル化していない

## 実施例 17

生オキアミ凍結肉（大洋漁業製）1 kg をフローズンカッターにより細碎し、これに食塩30 g、ソルビール（味の素製）100 g、新ねり味（味の素製）50 g、みりん40 g、馬レイシ、澱粉50 gを加えさらに2000ユニットのBTGaseを300 mlの冷水に可溶化後加えて、ステファン製カッターにて約6分混練した。混練直後の温度は5～6℃に制御した。このオキアミ肉ペーストを塩化ビニレン製のケーシングチューブ（クレ

ハ化学製）に充填し、50℃にて、1時間インキュベート後、沸とう湯浴中で25時間加熱した。加熱後流水中で冷却した後、物性測定をした。即ちサンプルを厚さ3 cmに切断し、直径7 mmの球形プランジャーを使用して、不動工業製レオメーターにて測定を行ない、破断強度を求めた。その結果を表18に示した。尚、コントロールは、BTGaseを予め、高温加熱変性して失活せしめたものを用い、同様の方法で調製した。

表 18

	破断強度 (g/cm <sup>2</sup> )
コントロール	286
BTGase 添加区	442

すなわち、BTGaseを加えたオキアミ肉のかまぼこ試作品はBTGaseを予め失活したコントロール区よりも格段に高い破断強度を示すことが認められた。

## 実施例 18

表19のレシピでうどんを作り、官能評価（n=15）と物性測定を実施した。

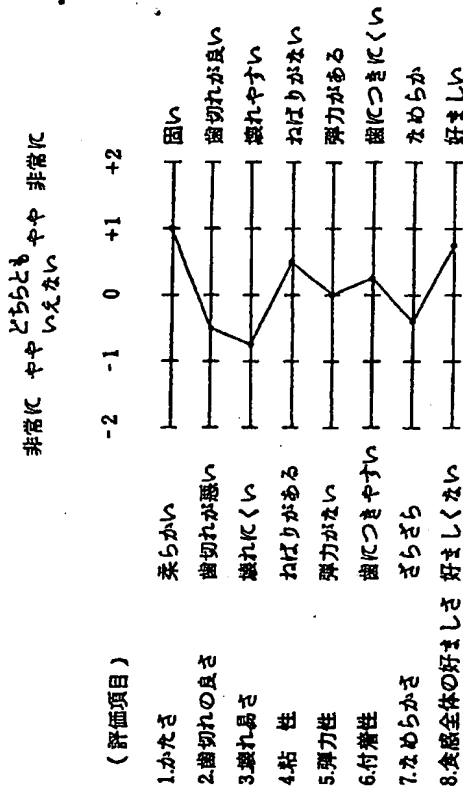
表 19

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
強力粉	36.4	36.4
薄力粉	36.4	36.4
食塩	0.5	0.5
水	26.7	26.7
BTG	—	0.04

BTGaseの添加量は蛋白質1 g当たり1 Uとし、室温で2時間酵素反応を行なった後、製麺した。官能評価および物性測定は12分間ゆでうどんで行なった。物性測定に用いた麺の長さは7 cm、レオメーター（不動工業製）を用いて引張り試験を行ない破断強度と破断するまでの伸びを測定した。結果を表20、表21に示した。

表 20 テクスチャープロファイル

(コントロールを0とした時のBTGase添加サンプルの評点)



BTGase の添加量は蛋白質 1g 当たり 1U とし、室温で 2 時間酵素反応を行なった後、パスタマシン (ラッキーコーヒメーカー製) で製麺した。官能評価および物性測定は 5 分 30 秒ゆでた麺で行なった。物性測定に用いた麺の長さは 7cm、レオメーター (不動工業製) を用いて引張り試験を行ない、破断強度と破断するまでの伸びを測定した。結果を表 23、表 24 に示した。

表 23 テクスチャープロファイル

(コントロールを0とした時のBTGase添加サンプルの評点)

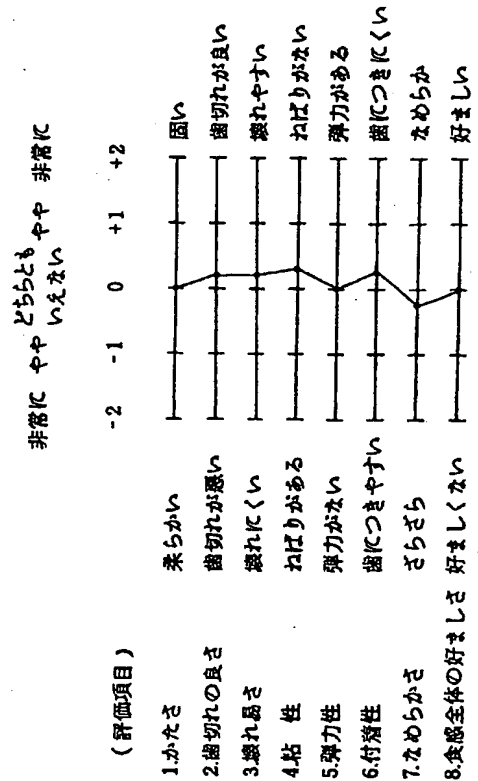


表 21

	破断強度 (g)	伸び (mm)
コントロール	706 ± 23	64 ± 5
BTG	885 ± 48**	51 ± 13

n = 10 \*\*危険率 1% で有意差あり

官能評価、物性測定の結果はよく一致しており、BTGase を添加することにより、グルテン分子の間に架橋構造が生成し、シコシコした讃岐うどんに近い食感の麺が出来ることが明らかになった。

#### 実施例 19

表 22 のレシピでスパゲティを作り、官能評価 (n = 15) と物性測定を実施した。

表 22

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
強力粉	73.7	73.7
食塩	0.6	0.6
水	25.7	25.7
BTG	-	0.04

表 24

	破断強度 (g)	伸び (mm)
コントロール	29±2	77±7
BTG (1U/g)	27±1	54±9**

n = 10    \*\*危険率1%で有意差あり

BTGase をスベゲティに作用させても表23のよ  
うに食感に大きな変化は生じなかったが、製造工  
程でミキシングした粉がサラサラしており、スク  
リューへのフィーディングがスムーズでシリンダ  
ー内の発熱が少ないなど作業性が大幅に改善され  
た。

## 〔発明の効果〕

本発明の微生物由来の BTGase は安価に供給され、  
かつ精製も容易であるので実用性が大である。

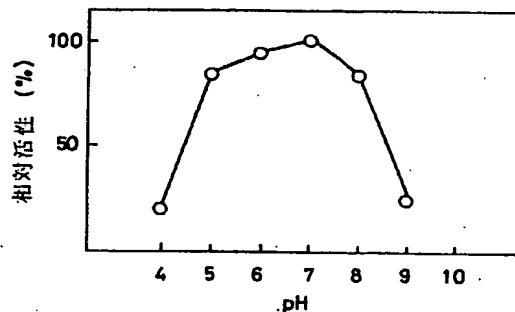
また、BTGase を用いることにより、カルシウム  
非存在下で又カルシウム存在下でも酵素(BTGase)  
濃度及び基質濃度が非常に低いところで品質の優  
れたゲル化物を製造できるという利点がある。

## 4. 図面の簡単な説明

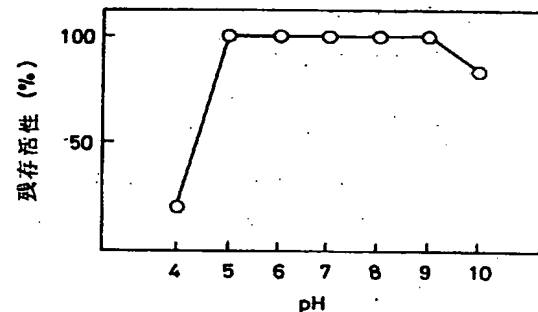
第1図、第2図、第3図及び第4図は本願発明  
の BTG-1 の至適 pH 曲線、至適温度曲線、pH 安定曲  
線及び温度安定曲線を示すものであり、第5図、  
第6図、第7図及び第8図は本願発明の BTG-2 の  
至適 pH 曲線、至適温度曲線、pH 安定曲線及び温度  
安定曲線を示すものであり、第9図、第10図、  
第11図及び第12図は、本願発明の BTG-3 の至  
適 pH 曲線、至適温度曲線、pH 安定曲線及び温度安  
定曲線を示すものである。

特許出願人    味の素株式会社  
天野製菓株式会社

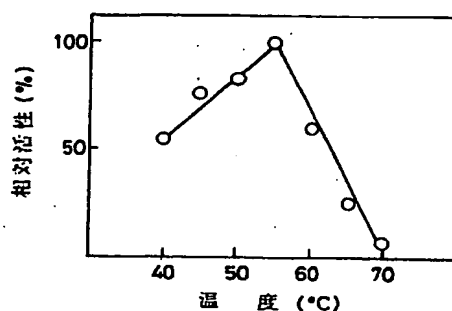
第 1 図



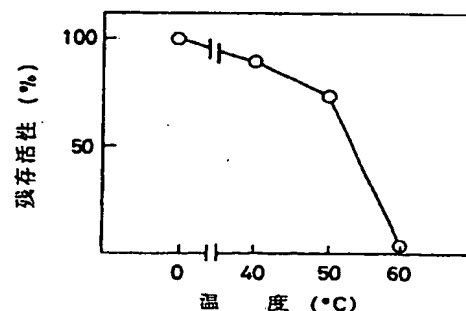
第 3 図



第 2 図

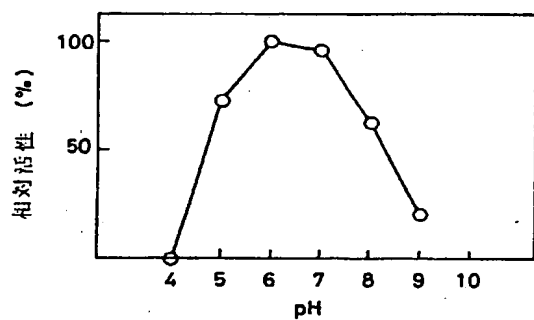


第 4 図

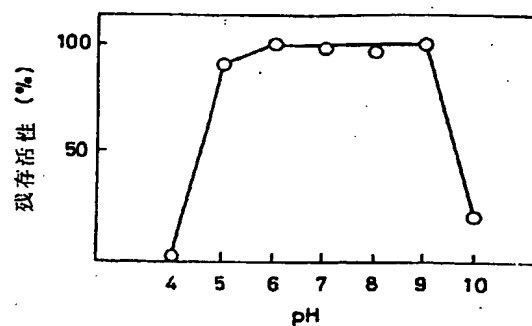




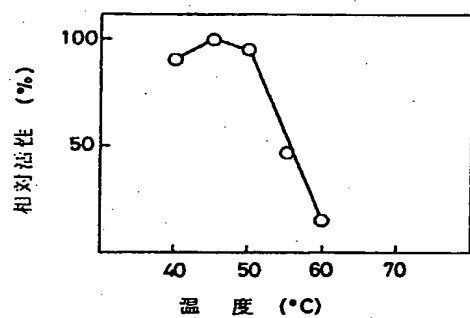
第 5 図



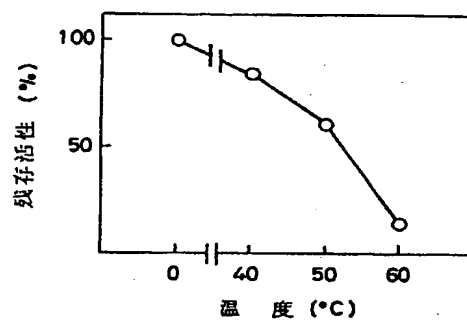
第 7 図



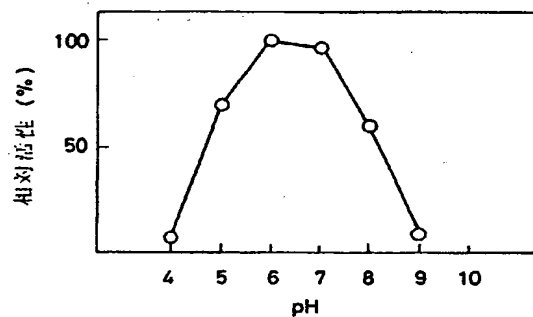
第 6 図



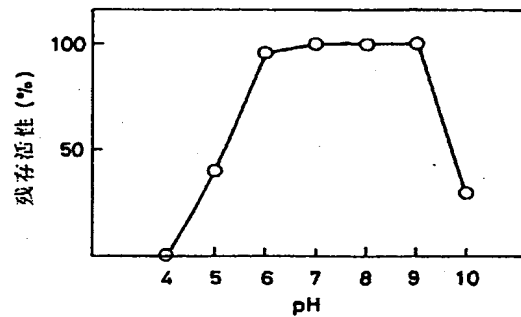
第 8 図



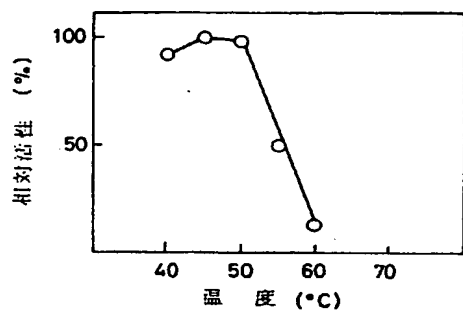
第 9 図



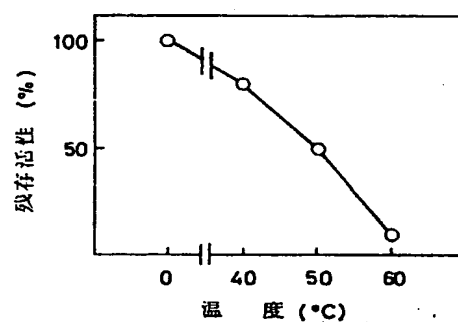
第 11 図



第 10 図



第 12 図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

// A 23 C 19/032  
 A 23 J 3/00  
 A 23 L 1/03  
 1/04  
 (C 12 N 9/10  
 C 12 R 1:01)

8114-4B  
 X-7236-4B  
 7235-4B  
 8114-4B

⑭発明者	田中	晴生	神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑮発明者	内尾	良輔	東京都中央区京橋1-5-8 味の素株式会社内
⑯発明者	松浦	明	愛知県春日井市松本町539-2
⑰発明者	安藤	裕康	愛知県江南市古知野町千丸221
⑱発明者	梅田	幸一	岐阜県羽島郡笠松町北及字北山1984-25